平成２２年度農政課題解決研修

野菜などの難防除病害虫の防除技術
（A コース）

研修テキスト

タバココナジラミのバイオタイプ判定と保毒虫の検出技術、
総合防除の取り組み

野菜茶業研究所
野菜 IPM 研究チーム
北村登史雄、本多健一郎

１．はじめに

コナジラミ類はウンカ、ヨコバイ、アブラムシ、カイガラムシ類などと同様に半翅目の同翅亜目（Homoptera）に属し、蛹の発育段階を持たない不完全変態昆虫である。成虫、幼虫ともに口針で植物の汁液から栄養を摂取し、甘露を排泄する。コナジラミ類の生物学的特徴として、幼虫期に固着生活を送ることが挙げられる。卵から孵化した１齢幼虫は crawler と呼ばれ歩行能力を持つが、２齢になると脚を持たない固着生活者となる。幼虫期は４齢まであり、４齢幼虫の終期には成虫の眼点が外から透けて見えるようになる。

日本国内で野菜を加害するコナジラミ類は、オンシツコナジラミとタバココナジラミである（末尾写真参照）。オンシツコナジラミ *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood)は 1974 年に広島県で初めて発見された侵入害虫で、全国各地の施設で野菜や花き類に発生する。本種が多発すると排泄された甘露にすす病が発生し、農作物の品質を低下させる。また、キュウリ黄化病の病原ウイルスを媒介する。タバココナジラミ *Bemisia tabaci* (Gennadius)は、日本に以前から分布していたが、1989 年に海外からバイオタイプ B（シルバーリーフコナジラミ）が侵入し、施設栽培の野菜や花き類を中心に国内各地へ分布を広げた。さらに 2004 年には別系統であるバイオタイプ Q の侵入も確認され、現在国内各地で分布が拡大している。タバココナジラミも高密度になると排泄物にすす病が発生し農作物の品質を低下させるが、吸汁した植物に白化症や着色異常を発生させることによる被害も問題となる。さらに、トマト黄化葉巻病やウリ類の退緑黄化病の病原ウイルスを媒介するため、トマトやメロンなどの生産で深刻な阻害要因となっている。

ここでは、最近各地で問題となっているタバココナジラミのバイオタイプ判定と保毒虫の検出技術、総合防除対策について紹介したい。

２．タバココナジラミのバイオタイプ

タバココナジラミは形態的に区別できる特徴が乏しいため、過去に世界各地で様々な植物から採集された多くのコナジラミ個体群が、単一の「タバココナジラミ」として整理・記載された。このため、タバココナジラミは世界中に分布し、おびただしい数の作物を加害する「大害虫」として扱われている。しかし、タバココナジラミには寄主植物の異なる寄主レースや形態以外の生物学的特徴が異なる 20 種類以上のバイオタイプが知られている。

なかでも北米産のバイオタイプ A と中東原産で世界各地に世界各地に分布を広げたバイオタイプ B の間には、生化学的な特徴、遺伝子解析による特徴、寄主植物に与える生理障害の有無、個体群間の交雑能力などで大きな差異が存在する。このため、Bellows et al.（1994）は両者が種のレベルで異なっていると考え、バイオタイプ B を別種シルバーリーフコナジラミ *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring として記載した。

しかし今日では、タバココナジラミは潜在種（cryptic species）であるシルバーリーフコナジラミを含めて、数多くのバイオタイプからなる種複合（species complex）として扱われるべきと考えられている（Perring, 2001）。

３．日本に分布するタバココナジラミのバイオタイプ

日本では、従来からスイカズラやサツマイモ等に生息するタバココナジラミ（在来系統）が本州以西に分布することが知られている（宮武，1980）。また、沖縄県などの南西諸島では、本州の在来系統とはアイソザイムのバンドパターンやミトコンドリア 16S rRNA 遺伝子の塩基配列が異なる別系統のタバココナジラミの分布が報告されている（大泰司・岡田，1996：Lee and De Barro, 2000）。これら在来のタバココナジラミは農作物で多発生することは少なく、農業生産上の重要害虫ではなかった。

しかし 1989 年にタバココナジラミのバイオタイプ B（シルバーリーフコナジラミ）が海外から侵入すると、国内各地で分布を広げて各種の野菜や花き類を加害するようになった（松井，1993：1995a）。バイオタイプ B は高密度で寄生すると作物の生育を阻害し、幼虫が排出した甘露に発生するすす病によって収穫物の品質低下をもたらすほか、多くの作物で葉や茎、果実を白化させ、トマトでは色彩異常果を発生させることも問題となった。1996 年に TYLCV が侵入した後は、本ウイルス病の媒介虫としてその防除がより切実な問題となり、タバココナジラミに対する薬剤防除回数も増加することとなった。

さらに最近は、スペインを原産地とする別系統のタバココナジラミ（バイオタイプ Q）の日本への侵入が確認され（Ueda and Brown, 2006）、東北地方から九州までの広い地域（41 都府県）に分布を拡大していることが明らかになった（図１）。

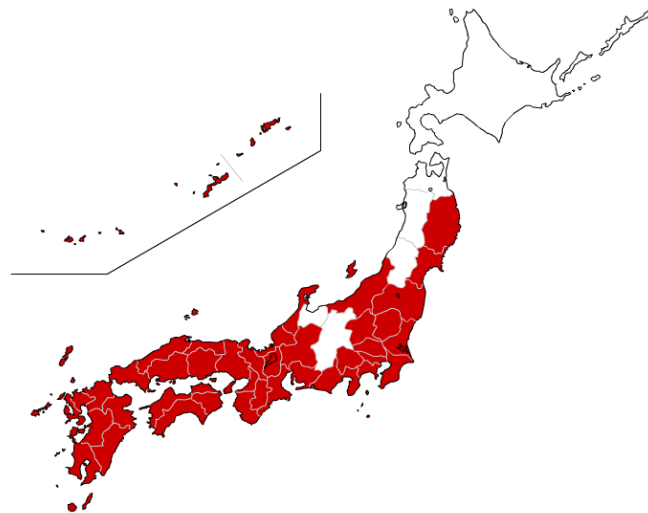



図１．バイオタイプ Q が確認された都府県（2009 年 5 月現在）

Ueda et al.（2009）は、日本国内で発生するタバココナジラミのバイオタイプについてミトコンドリア CO1 遺伝子の塩基配列などの解析を行い、本州以西でスイカズラ等に生息する在来系統をバイオタイプ JpL と命名した。また、南西諸島に分布する別の在来系統はバイオタイプ Nauru であることも明らかにした。従って、現在日本国内で発生しているタバココナジラミには、主に４種類のバイオタイプ（JpL、Nauru、B、Q）が含まれている。

４．DNA 多型によるバイオタイプの識別

タバココナジラミの各バイオタイプはそれぞれ各種殺虫剤に対する感受性が異なるため、そのバイオタイプを判別することは農業上重要である。しかし、各バイオタイプ間は形態で判別することが出来ない。バイオタイプを判別する方法として、アイソザイムや DNA の多型を利用する分子生物学的方法がある。ここでは近年多く用いられている DNA 多型によるバイオタイプの判別について解説する。

・タバココナジラミの採集

DNA 多型によるタバココナジラミのバイオタイプの識別は幼虫、成虫から DNA の抽出・分析が可能である。しかし、野外からサンプリングする場合、体サイズが大きく取扱が簡単な、成虫もしくは老齢幼虫を採集することが望ましい。採集方法は成虫の場合は吸虫管により植物体上に寄生する個体を採取し、あらかじめ用意したアセトンまたはエタノール入りの管瓶に保存する。幼虫の場合は寄生している葉ごと実験室内に持ち帰り、虫針や面相筆等を用いて植物体より剝がし、成虫と同様にアセトンまたはエタノール入りの管瓶中で保存する。アセトンに浸漬したタバココナジラミは 2 年程度の室温での保存が可能であるが、長期間保存する場合はこれらの保存液の揮発による乾燥に注意する必要が有る。

・DNA 抽出

昆虫から DNA を抽出する方法には様々な方法があるが、それぞれ予算、求める DNA の純度などにより、選定すると良い。もちろん DNA の純度が高い方が、次の操作における成功率は高くなるが、タバココナジラミバイオタイプ判別であれば最も簡便なキレックス法で十分である。

ア）キレックス法(三浦，2010)

マイクロチューブに分注した Chelex 100（BioRad 社）の 5%懸濁液中でタバココナジラミ１頭を磨砕し、Proteinase K (20mg/ml)を加え、56℃で 2 時間以上、99.9℃3 分処理する。56℃での処理は 24 時間以上の法が好ましい。処理後は 5℃または-20℃で保存できる。上澄みを DNA 溶液として PCR や LAMP 法に利用することが出来る。Chelex は金属イオンなどの以後の PCR などの酵素反応の阻害物質を吸着し、Proteinase K は細胞膜や酵素などのタンパク質を分解する。

イ）簡易法（Ghanim et.al., 1998)

マイクロチューブに分注した抽出バッファー（100μｇ/ml Proteinase K, 0.45% Triton X-100, 0.45% Tween20, 1 M Tris-HCl, pH8）中でタバココナジラミ１頭を磨砕し、55℃、1 時間、100℃、10 分間、インキュベートする。遠心後、上澄みをテンプレートとして遺伝子解析に用いる。

ウ）キットを用いる方法

更に純度が必要な場合は、各社から販売されている DNA 抽出キットを用いる。キットには昆虫専用のものもあるが、動物細胞用のもので十分である。筆者らはキアゲン社の DNeasy Blood and Tissue Kit 用いて DNA の抽出を行っている。DNA 抽出の手順等はキットに添付されているプロトコールを参考に行っていただきたい。

・DNA 多型によるタバココナジラミバイオタイプの識別

DNA 多型によるバイオタイプの識別には塩基配列を解析する方法、制限酵素断片長多型（PCR-RFLP 法)、マルチプレックス法、LAMP 法の 4 種類が行われている。それぞれ利

点と欠点があるので、目的と求められる精度により、使い分けると良い。

（１）塩基配列解析

特定の遺伝子領域の塩基配列を解析し、バイオタイプを判別する方法である。最も確実な方法であり、未知のバイオタイプが出現したときにも対応できるが、時間およびコストが掛かる。用いられる遺伝子領域は 16S ribosomal subunit (16S) (Frohlich et.al., 1999)、ribosomal intergenic transcribed spacer I (ITS I) (De Barro et.al., 2000)、そして mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) (Frohlich et.al., 1999) である。このうち、COI はデータの蓄積も多く、DNA バーコーディングプロジェクトでも使用されている。筆者らは COI 領域の特異的プライマー（C1-J-2195、L2-N-3014）を用いて PCR 反応を行い、約 866bp の PCR 産物をダイレクトシーケンスに供し、得られた塩基配列をデータベース上の配列と照合することにより、バイオタイプの識別を行っている。

（２）PCR-RFLP

PCR-RFLP 法は最も失敗の少ない方法の一つで、遺伝子の特定の領域を PCR により増幅させた後、それぞれのバイオタイプの PCR 産物を特異的に認識する制限酵素により切断することによって識別する方法である。上田(2006)の方法は COI 領域の特異的プライマー（C1-J-2195、L2-N-3014）を用いて PCR 反応を行い、約 866bp の PCR 産物に対してバイオタイプＢを特異的に切断する制限酵素（*Stu* I)、またはバイオタイプ Q を特異的に切断する制限酵素（*Eco*T14I （*Sty* I)）を用いて酵素反応を行い、得られた DNA 断片を電気泳動し、バンドパターンで識別する。すなわち、バイオタイプ B では *Eco*T14I（*Sty* I）で１本、*Stu* I で 560bp と 306bp の２本、バイオタイプＱでは *Eco*T14I（*Sty* I）で 555bp と 311bp の２本、*Stu* I で１本のバンドが見られる。切断されたバンドのサイズが異なる、もしくはバンドが切断されない場合は PCR 産物である約 866bp の DNA 断片をシーケンスに供することによりバイオタイプを識別することが出来る。

（３）マルチプレックス法（三浦、2007）

マルチプレックス法は一度の PCR 反応に複数のプライマーセットを使用し、得られる PCR 産物を電気泳動し、バンドパターンにより識別する方法である。三浦らは本法によりタバココナジラミバイオタイプ B、Q およびオンシツコナジラミを識別する方法を開発している。タバココナジラミから抽出した DNA 溶液に対して各バイオタイプ共通またはそれぞれのバイオタイプ特異的な６種類のプライマーを加えた PCR 反応後、反応産物に電気泳動を行い、オンシツコナジラミおよびそれぞれのバイオタイプ特異的なバンドパターンにより識別する。この場合、バイオタイプ B は約 600bp と 530bp に、バイオタイプ Q では 530bp と 270bp に、オンシツコナジラミでは 530bp と 1000bp にバンドが見られる。マルチプレックス法は PCR 反応と電気泳動だけでバイオタイプの識別が可能であるため、非常に簡便でしかも安価である。しかし、反応系が複雑になるためにこれ以上の種類のバイオタイプの識別は出来ない。又、530bp のバンドしか確認されない、または未知のバンドが見られた場合は識別出来ない。これらのバイオタイプを識別するためにはゲル上の 530bp のバンド中の DNA をシーケンス等に供する必要がある。

（４）LAMP 法

LAMP 法はニッポンジーンが発売している“タバココナジラミバイオタイプＱ検出キット”を用いて行う。LAMP 法は PCR 反応と同様に DNA を増幅させる方法の一つであるが、

PCR と違い一定温度で反応が進むため、サーマルサイクラーなどの専用の機器がいらないために簡便に行うことが出来る。本キットでは添付のＤＮＡ抽出液中で供試するタバココナジラミを磨砕し、撹拌後スピンダウン、得られた上澄みをテンプレートとする。蛍光色素の入ったＬＡＭＰ反応液にテンプレートを加え、65℃1 時間反応し、バイオタイプＱ由来のＤＮＡのみが増幅される。反応後 80℃、2 分間の加熱で反応を停止する。反応チューブにＵＶを照射するとバイオタイプＱであれば、蛍光を発する。LAMP 法では DNA の抽出を含めても識別に要する時間は 3 時間程度であり、マルチプレックス法の約 7 時間程度、シーケンス法の 12 時間程度と比較して非常に短時間で識別出来る（安達ら、2010）。LAMP 法では一方、PCR の様に反応産物のサイズにより目的となる DNA であるか確認できないため、目的外の生産物が増殖していても分からない。また、非常に感度が高いために常にコンタミネーションが起きないように細心の注意を払う必要がある。本キットでは供試したタバココナジラミがバイオタイプ Q であるか否かは識別出来るか、Q でなかった場合、B であるのか JpL であるのか、またはオンシツコナジラミの混入であるのか判断することは不可能である。

・バイオタイプ識別法の選択

タバココナジラミのバイオタイプを識別するためには上記のように種々の方法があるが、それぞれ目的により選択する必要がある。未知のバイオタイプが発生している可能性ある場合は塩基配列解析、確実にバイオタイプの識別をしたい場合は PCR-RFLP 法、多数のタバココナジラミのバイオタイプを識別したい場合はマルチプレックス法、分子生物学的実験のあまり経験の無い者が少数の識別をしたい場合は LAMP 法が良い(安達ら、2010)。またサンプル当たりのコストも重要であるが、塩基配列解析は試薬のみで 300 円程度（この他にシーケンシング経費必要、筆者ら試算）、PCR-RFLP 法は 170 円程度（筆者ら試算）、マルチプレックス法が 60 円(三浦、2007)、LAMP 法は 1,720 円（ニッポンジーン価格表より計算）である。

５．保毒虫からの TYLCV 検出方法

保毒虫の検定は主にウイルスの DNA を検出する手法である PCR 法、および LAMP 法により行われている。４．DNA 多型によるバイオタイプの識別と同様の手法で検出することが可能である。タバココナジラミの採集および DNA の抽出は前稿と同様の手法である。PCR は TYLCV に特異的なプライマー（TY プライマー（大貫・花田、2000）、STG/NTG プライマー（大貫ら、2004）など）を用いて PCR 反応を行い、反応産物を電気泳動にて TYLCV 特異的なバンドにて検出する。LAMP 法ではニッポンジーンから上市されているトマト黄化葉巻病診断キットにより検出できる。前稿とほぼ同様の方法であるが Ver.1 の場合、ウイルス DNA の増加に伴う反応液の白濁でウイルスを検出し、Ver.2 ではバイオタイプ Q 検出キットと同様、UV 照射による蛍光で検出する。LAMP 法は簡便で、検出感度も高いが、その検出感度の高さ故に常にウイルスの混入による誤判定に注意を払わねばならない。現在の所、TYLCV の検出には遺伝子による診断しか方法がないが、より簡便でコストの掛からない DAS-ELISA 法などの免疫学的手法の開発が望まれている。

６．化学的防除技術

日本在来のバイオタイプ JpL については、強い殺虫剤抵抗性は報告されなかった。1989 年頃侵入したバイオタイプ B は、オンシツコナジラミに有効であった多くの有機リン剤、合成ピレスロイド剤に対して抵抗性を示したため、各種薬剤に対する感受性検定と新たな有効薬剤の探索が進められた（浜村，1999)。その結果、イミダクロプリド、ニテンピラムなどのネオニコチノイド系殺虫剤を中心とする新規薬剤が導入・登録され、タバココナジラミの防除に活用されるようになった。

しかし、最近日本で発生が確認されたバイオタイプ Q では、スペイン、イタリア、ドイツの個体群でネオニコチノイド系殺虫剤に対する高度の交差抵抗性が報告され、イスラエルでは殺虫剤ピリプロキシフェンに対する高度の抵抗性発達が示されている（Nauen et al., 2002：Horowitz et al., 2003)。日本で確認されたバイオタイプ Q の個体群についても、海外と同様に高い殺虫剤抵抗性を有していることが明らかにされつつある。今後はバイオタイプ Q に対して有効な薬剤を探索するとともに、抵抗性の発達しにくい気門封鎖型殺虫剤や、天敵に影響の少ない殺虫剤の効果的な使用方法を検討する必要があろう。

７．生物的防除技術

タバココナジラミに対しては、オンシツコナジラミを対象とした天敵寄生蜂オンシツツヤコバチ *Encarsia formosa* が利用できる。オンシツコナジラミとタバココナジラミが同時に発生している場合、オンシツツヤコバチがオンシツコナジラミを好んで寄生してしまい、タバココナジラミが逆に増加したという事例もあるが（松井・中島，1991)、オンシツツヤコバチはコナジラミ密度が高いとき寄主を選り好みするので、十分な数のオンシツツヤコバチをコナジラミの増殖開始時期から反復して放飼すれば、２種のコナジラミを同時に制御することができる（松井，1995b)。

また、タバココナジラミ専用の天敵寄生蜂チチュウカイツヤコバチ *Eretmocerus mundus* も市販されており、オンシツツヤコバチよりも優れた防除効果を発揮するとされている。

タバココナジラミに有効な微生物農薬として、ボーベリア・バシアーナ、バーティシリウム・レカニ、ペキロマイセス・フモソロセウスが有効で、登録市販されている。これら微生物農薬を効果的に使用するためには、感染に好適な温度と湿度条件を設定する必要がある。

８．物理的防除技術

・黄色粘着板

アブラムシやコナジラミが黄色の色彩に誘引されることはよく知られている。さまざまな植物に寄生するタバココナジラミ（バイオタイプ B）成虫が黄色に強く誘引されるため、黄色粘着トラップはコナジラミ成虫が施設へ侵入するのを防ぐほか、発生個体数をモニタリングすることにより天敵放飼のタイミングを知ることができる（三宅ら, 1991：林, 1999)。

・近紫外線除去フィルム

タバココナジラミと天敵寄生蜂のいずれも、実験室条件では近紫外線を除去した環境を避けることが知られている。しかし、近紫外線を除去した環境下でも、コナジラミ成虫は

黄色粘着板に誘引され、天敵による寄生率も変化しないことが分かった（嶋田，1994：鹿島・松井，1998ab）。近紫外線除去フィルムの展張は害虫の侵入を防ぎ、施設内の昆虫の活動を抑制するが、昆虫の繁殖活動や寄生活動を完全に妨げるわけではない。

・光反射シート

温室内および外縁部に光反射シートを設置すると、タバココナジラミの侵入や繁殖を抑制することができる。下からの光反射によって、コナジラミの飛翔行動や繁殖行動が阻害されるためだと考えられている（長塚，2000）。

・防虫ネット

タバココナジラミ成虫の侵入を抑制するだけであれば、1mm メッシュのネットでも一定の効果が認められた（青木ら，1992）。しかし TYLCV を保毒したタバココナジラミ成虫の侵入を防止するためには、より細かな目合いのネットを開口部に展張する必要がある。タバココナジラミ成虫の通過を 80%以上阻止するためには、0.4mm 以下の目合いが必要であった（渡邊，2006）。しかし細かな目合いの防虫ネットを使用した場合、施設内の温度上昇による作業環境の悪化やトマトの生育に対する悪影響が問題となる。また、同じ目合いでも素材（糸の太さや織り方）によって空気の透過性が異なる場合もあるので、資材の選択にあたっては、タバココナジラミ成虫の通過率、ネットの空隙率、耐久性、価格などを勘案するとともに、他の防除技術との組み合わせも考慮して検討する必要がある。

９．タバココナジラミとトマト黄化葉巻病の総合防除

タバココナジラミによる被害は、直接的な吸汁害よりもトマト黄化葉巻病などのウイルス病媒介が中心である。従ってタバココナジラミ自体を防除するよりも、ウイルスの伝染環を断ち切るような、総合的な管理技術が重要となる。

タバココナジラミは夏季には多くの種類の寄主植物で育ち、これら罹病トマト以外の植物で発育した大多数のコナジラミは病原ウイルス（TYLCV）を持たない無毒虫である。熊本県の調査によれば、雑草地で捕獲されたタバココナジラミ成虫はすべて無毒虫であり、罹病トマトの栽培施設内で捕獲された個体のみ保毒虫であった（長崎県総合農林試験場ほか，2004）。野菜茶業研究所が 2004 年に三重県北部のトマト栽培地帯で行った調査では、８月から 11 月にかけて野外に設置したトマト苗で捕獲されたタバココナジラミ成虫の TYLCV 保毒率は、全体で 10～15%以下という低い値であった（本多・北村，2005）。

大部分が無毒虫である野外のタバココナジラミ個体群を殺虫剤散布などによって徹底防除しても、TYLCV 保毒虫に対する防除効果は低い。むしろ保毒虫の発生源である罹病した野良生えトマトを除去し家庭菜園トマトで防除を行って保毒虫そのものを減らす方が、TYLCV に対する防除効果は高いと考えられる。また、トマト栽培終了時に株を抜根し、完全に枯死するまで施設を密閉する蒸し込み処理を行うことによって、保毒虫の施設外への脱出を阻止すると同時に病原ウイルスの野外への放出も防止することができる（古家，2006）。

施設開口部への防虫ネット展張や近紫外線除去フィルムの使用による保毒虫侵入の防止、定植時の粒剤処理等を組み合わせることによって、トマト黄化葉巻病の発生を効果的に抑制することができる（小川，2004：小川ら，2004）。また、防虫ネット展張と定植後の気門封鎖剤および糸状菌製剤の散布によっても黄化葉巻病の発生を抑制できる（溝辺，2006）。

こうした防除技術を基本として、黄色粘着板や黄色粘着テープによるコナジラミ成虫の捕殺や、春の施設内コナジラミ密度を抑制する天敵寄生蜂の利用など、各種の防除手段を効果的に組み合わせながら施設内外の保毒虫密度とウイルス量を減少させていくことが、トマト栽培地帯におけるトマト黄化葉巻病の流行防止につながると言えよう。野菜茶業研究所では、トマト黄化葉巻病の防除に関する技術指針（野菜茶研，2009）を取りまとめたので、参考にしていただきたい。

引用文献

青木克典・下畑次夫・野村康弘（1992）岐阜県におけるタバココナジラミの発生と被覆資材による防除効果. 関西病虫研報 34: 55

安達 鉄矢・梅澤 類・山口 洋史・北村 登史雄・本多 健一郎・柴尾 学・那須 義次・田中寛（2010）シークエンス法と LAMP 法を利用した大阪府におけるタバココナジラミのバイオタイプ判別. 関西病虫研報　52: 103-104 .

Bellows Jr., T. S., T. M. Perring, R. J. Gill and D. H. Headrick（1994）Description of a species of *Bemisia* (Homoptera: Aleyrodidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 87: 195-206

DeBarro, P. J. and P. J. Hart (2000) Mating interactions between two biotypes of the whitefly, Bemisia tabaci (Hemiptera: Aleyrodidae) in Australia. Bull. Entomol. Res. 90:103-112.

Frohlich, D. R., I. Torres-Jerez, I. D. Bedford, P. G. Markham and J. K. Brown (1999)　A phylogeographical analysis of the *Bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers. Mol. Ecol. 8: 1683-1691.

古家　忠（2006）タバココナジラミ（バイオタイプ B）の高温耐性とハウス密閉処理による防除効果. 植物防疫 60: 544-546

Ghanim, M., S. Morin, M. Zeidan and H. Czosnek. 1998. Evidence for transovarial transmission of Tomato yellow leaf curl virus by its vector, the whitefly *Bemisia tabaci* . Virology 240: 295-303

浜村徹三（1999）各種散布薬剤に対するシルバーリーフコナジラミの薬剤感受性. 野菜茶試研報 14: 177-187

林　英明（1999）粘着板によるコナジラミ類の予察と防除. 植物防疫 53: 226-232

本多健一郎・北村登史雄（2005）シルバーリーフコナジラミが媒介するトマト黄化葉巻病の感染時期とコナジラミ密度，保毒率の関係. 第 49 回日本応用動物昆虫学会大会講要. 198

Horowitz, A.R., I. Denholm, K. Gorman, J. L. Cenis, S. Kontsedalov and I. Ishaaya (2003) Biotype Q of *Bemisia tabaci* identified in Israel. Phytoparasitica 31: 94-98

鹿島哲郎・松井正春（1998a）近紫外線除去フィルムがトマトの主要害虫およびその天敵の生存など活動に及ぼす影響. 関東病虫研報 45: 185-189

鹿島哲郎・松井正春（1998b）近紫外線除去フィルムが害虫およびその天敵に及ぼす影響. (2) シルバーリーフコナジラミおよび天敵オンシツツヤコバチ、エレトモセルス・カリフォルニクスに及ぼす影響. 茨城農総セ園研研報 6: 37-41

Lee, M.L. and P.J. De Barro（2000）Characterization of different biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera; Aleyrodidae) in South Korea based on 16S ribosomal RNA sequences. Korean J. Entomol. 30: 125-130

松井正春（1993）タバココナジラミの最近における発生と防除. 植物防疫 47: 118-119

松井正春（1995a）タバココナジラミ新系統（仮称：シルバーリーフコナジラミ）の発生とその防除対策. 植物防疫 49: 111-114

松井正春（1995b）タバココナジラミとオンシツコナジラミの混在下におけるオンシツツヤコバチの密度抑制効果. 関西病虫研報 37: 15-16

松井正春・中島武彦（1991）タバココナジラミとオンシツコナジラミの共存下におけるオンシツツヤコバチの寄主選好性. 関西病虫研報 33: 93-94

三宅律幸・加藤昌章・山下重樹（1991）色彩の相違によるタバココナジラミの誘因効果について. 関西病虫研報 33: 84

宮武頼夫（1980）日本産コナジラミ類総目録. Rostria 32: 291-330

三浦一芸（2007）タバココナジラミバイオタイプ Q の簡易識別法–マルチプレックス PCR 法の利点–. 植物防疫　61:315–318

三浦一芸（2010）昆虫類やダニ類からの DNA 抽出と PCR の実践. 植物防疫　64:620–625

溝辺　真（2007）物理的・生物的防除による促成栽培トマトのタバココナジラミ対策. 今月の農業 51(3): 35-40

長崎県総合農林試験場・福岡県農業総合試験場・熊本県農業研究センター（2004）トマト黄化葉巻病の病原ウイルス及びシルバーリーフコナジラミの生態解明に基づく環境保全型防除技術の確立. 九州新技術地域実用化研究成果 No.47. 156pp

長塚　久（2000）光反射シートによるコナジラミ類およびアザミウマ類の行動抑制. 植物防疫 54: 359-362

Nauen, R., N. Stumpf and A. Elbert（2002）Toxocological and mechanistic studies on neonicotinoid cross resistance in Q-type *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) . Pest Manag. Sci. 58: 868-875

Perring, T.P.（2001）The *Bemisia tabaci* species complex. Crop Protection 20: 725-737

小川恭弘（2004）物理的防除法によるコナジラミ類およびトマト黄化葉巻病の防除効果. 今月の農業 48(7): 58-62

小川恭弘・内川敬介・嶽本弘之・石井貴明・行徳　裕・古家　忠・江口武志（2004）植物ウイルス病研究会レポート 7: 111-120

大泰司誠・岡田忠虎（1996）タバココナジラミの防除に関する研究. 生理，生態の解明. 農林水産技術会議事務局. 研究成果 311: 8-24

大貫正俊・花田薫（2000）Print-capture PCR(P-PCR)法によるジェミニウイルス保毒虫の簡易検定. 九州病害虫研究会報　46:54–57

大貫正俊・小川哲治・内川圭介・加藤公彦・花田薫（2004）九州で発生したトマト黄化葉巻ウイルスの分子的特徴とその特異的検出. 九州沖縄農研報告　44:55–77

嶋田知英（1994）近紫外線除去フィルムによるタバココナジラミの防除効果と作用機作. 関東病虫研報 41: 213-216

Ueda, S. and J. K. Brown（2006）First report of the Q biotype of *Bemisia tabaci* in Japan by mitochondrial cytochrome oxidase I sequence analysis. Phytoparasitica. 34: 405-411

上田重文（2007）タバココナジラミバイオタイプQの簡易識別法−日本のバイオタイプ研究の幕開けとその背景−. 植物防疫 61:309-314

Ueda, S., T. Kitamura, K. Kijima, K.-I. Honda and K. Kanmiya（2009）Distribution and molecular characterization of distinct Asian populations of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) in Japan. J. Appl. Entomol. 133: 355-366

渡邊丈夫（2006）シルバーリーフコナジラミ対策の防虫ネット比較試験. 今月の農業 50(10): 18-21

野菜茶業研究所（2009）トマト黄化葉巻病の総合防除マニュアル. http://vegetea.naro.affrc.go.jp/joho/index.html

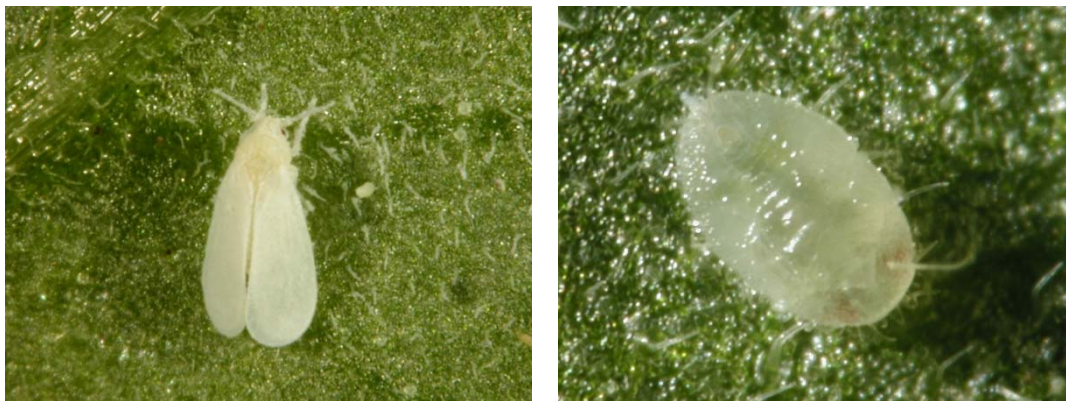



写真１　オンシツコナジラミの成虫（左）と幼虫（右）

写真２　タバココナジラミの成虫（左）と幼虫（右）

野菜ウイルス病の診断技術

野菜茶業研究所
野菜 IPM 研究チーム
寺見文宏・大西　純

Ⅰ　総論

野菜に発生するウイルス病は多種多様であり、ウイルス病を的確に診断することは防除対策を考える上で重要である。ウイルス病の診断においては、特定のウイルスによる感染の有無を明らかにする場合と、感染しているウイルスの種類を明らかにする場合とがある。後者の場合は、時として、未知ウイルスの同定を必要とすることがあり、ウイルスの同定には専門的な知識と技術を必要とする。そこで本研修では、ウイルス診断試薬などかそろっている特定の病原ウイルスの診断技術について、トマトのウイルス病を例に挙げて概説する。

１．トマトに発生する主なウイルス

アルファルファモザイクウイルス（AMV）
キク茎えそウイルス（CSNV）
キュウリモザイクウイルス（CMV）
ジャガイモウイルス X（PVX）
ジャガイモウイルス Y（PVY）
タバコ巻葉ウイルス（TbLCV）
トマト黄化えそウイルス（TSWV）
トマト黄化葉巻病の原因ウイルス（TYLCV）
トマトモザイクウイルス（ToMV）

２．病徴による診断

1）えそを伴わない葉のモザイク・奇形症状 ＝ モザイク病
推定される病原ウイルス：CMV, PVX,（TMV 抵抗性を持たない品種では ToMV も）
2）茎のえそ、葉の退緑・えそ，果実のえそ ＝ 黄化えそ病、茎えそ病、条斑病
推定される病原ウイルス：CSNV, TSWV, CMV, ToMV, PVX+ToMV
3）葉の退緑・黄化、葉巻・縮葉 ＝ 黄化萎縮病または黄化葉巻病
推定される病原ウイルス：TbLCV, TYLCV

３．生物検定法による診断

ウイルスはそれぞれ固有の宿主範囲があり、各宿主で特有の病徴を示す。この宿主範囲・病徴の違いを利用した生物検定法が、指標植物への接種試験である。時間と場所を

要するが、最も安価に実施できるウイルス診断技術である。表 1 に指標植物での各ウイルスの病徴をまとめた。ただし TbLCV と TYLCV はコナジラミによる虫媒接種試験が必要であるので省略した。両ウイルス以外は、葉の磨砕汁液をカーボランダムとともに塗沫して指標植物へ接種することで病原ウイルスを検出・診断することが出来る。

表 1　トマトに感染するウイルスの指標植物と病徴

	N. glutinosa		タバコ Bright Yellow		D.stramonium		アカザ		センニチコウ		ソラマメ	
	接種葉	上葉	接種葉	上葉	接種葉	上葉	接種葉	上葉	接種葉	上葉	接種葉	上葉
AMV	L	M	L	M	－	M	L	－	L	M	L	－
CMV	－	M	－	M	-	M	L	－	L	M	L	－
CSNV	L	－	L	VC	L	M	L	－	L	－	L	－
PVX	－	M	－	M	L	M	L	－	L	－	－	－
PVY	－	M	－	M	－	－	－	－	－	－	－	－
TMV	L	－	－	M	L	－	L	－	L	M	－	－
ToMV	L	－	L	－	L	－	L	－	L	M	－	－
TSWV	L	－	L	－	L	N, M	L	－	L	N, M	L	N

L：局部病斑, M：モザイク,　VC：葉脈透過, N：えそ

4．ウイルス抗体を利用した診断

精製したウイルス粒子をウサギ等に注射することにより、注射したウイルス粒子に対する抗体が産生される。先に挙げたトマトに発生する主なウイルスについては、TbLCV 以外のすべてのウイルスに対する診断用抗体が市販されている（日本植物防疫協会、Neogen 社、Agdia 社など）。トマト以外の作物についても、被害の大きいウイルスの抗体は多数市販されている。

抗体を利用したウイルス診断技術には様々のものがあるが、市販抗体の多くはイムノクロマト法（免疫試験紙）もしくは ELISA 法（酵素結合抗体法）のキットとして販売されているので、それぞれの技術について解説することとする。

1）イムノクロマト法

ニトロセルロース膜のストリップに固定化したウイルス抗体で、金コロイドで標識したウイルス抗体と反応したウイルスを捕捉して、ウイルス感染の有無を赤色のバンドとして肉眼判定できる試験方法である（図 1）。イムノクロマト法の特徴は、特別な装置を必要とせず、15 分程度で結果の判定ができ手軽である。市販されているキットは海外メーカーの製品のみであり、1 サンプルの診断に平均して 1500 円前後を要する。通常のウイルス検出には問題のない感度であるが、感染初期の検定や TYLCV のよう

な濃度の低いウイルスでは、感染していてもバンドが現れないことがある。

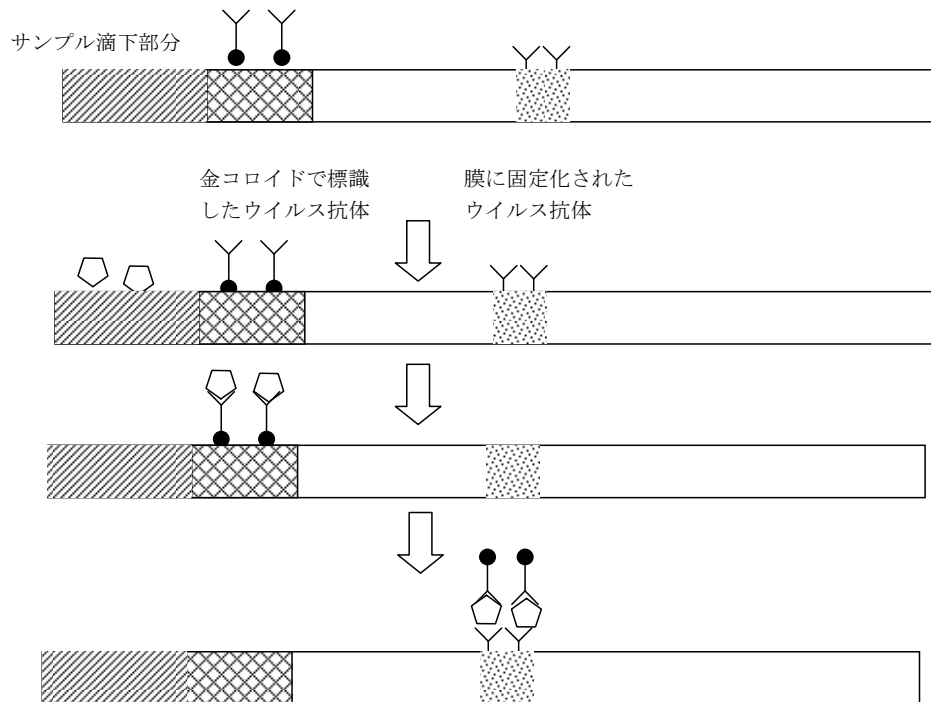



図１イムノクロマトによるウイルス検出の原

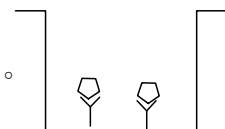
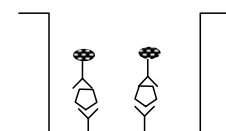
２）ELISA 法

ELSA 法は、アルカリフォスファターゼという酵素を結合させたウイルス抗体を用い、酵素反応で基質が発色する色程度でウイルスの有無・濃度を調べる技術である。ELISA 法にも各種の変法があるが、ここでは市販キットの多くが採用している直接二重抗体サンドイッチ ELISA（DAS-ELISA）法を紹介する。細かい反応時間等は製品の説明書参照のこと。

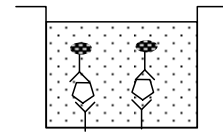
【DAS-ELISA の手順】

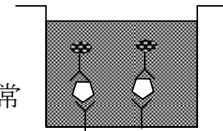
①コーティング抗体のマイクロタイタープレートへの吸着

ウイルス抗体を pH10.0 前後のコーティング液で希釈して、マイクロタイタープレートのウェルに入れて、ウェル内壁に吸着させる。キット付属の洗浄液でウェルを洗浄するなお抗体コーティング済みのキットも多い。

②検定サンプルの希釈汁液を加え、抗体と反応させた後、洗浄する。

③酵素結合ウイルス抗体の添加

希釈した酵素結合ウイルス抗体を加え、コーティング抗体で捕捉されているウイルスと反応させた後、洗浄する。

④基質液の添加

酵素の基質液（p-nitrophenyl phosphatet が最も一般的）を加える。

⑤結果の判定

基質液の着色の有無を調べる（p-nitrophenyl phosphatet の場合黄色に発色する）。吸光度を調べるときは波長を 405nm とし、通常 0.1 以上の値を陽生とする。

ELISA 法はイムノクロマト法に比べると、感度は同等で 1/10～1/50 のコストで診断できる。日本植物防疫協会が販売する ELISA 法キットでは、1 サンプル当たりのコストが 20 円以下と安価であるが、必ずしも品揃えが豊富とはいえず、トマトに発生するウイルスについてみても、AMV, CSNV, TbLCV, TYLCV の抗体は販売していない。海外メーカーの製品では 1 サンプル当たりのコストが 200～300 円と高くなるが、イムノクロマト法に比べるとまだ遙かに安価である。海外製品の場合、ポジティブコントロールにウイルスが添付されている製品があるので、この場合農林水産大臣の特別輸入許可が必要となるので注意が必要である。ELISA 法の問題点は、結果の判定までに半日から 2 日を要し、遠心機や吸光度計などの機器が必要な点である。

日本植物防疫協会が扱っている抗体について参考までに以下に示した。

RSV:イネ縞葉枯ウイルス
RDV:イネ萎縮ウイルス
BaYMV:オオムギ縞萎縮ウイルス
CYVY:クローバー葉脈黄化ウイルス
BeYMV:インゲンマメ黄斑モザイクウイルス
PSV:ラッカセイわい化ウイルス
ABMV:アズキモザイクウイルス
BBWV:ソラマメウイルトウイルス
PVX:ジャガイモウイルス X
PVX:ジャガイモウイルス Y
TMV-OM:タバコモザイク−普通系
ToMV:モザイク−普通系
PMMoV:トウガラシマイルドモットルウイルス
TMV-W:タバコモザイク−ワサビ系
CMV:キュウリモザイク
TSWV:トマト黄化えそウイルス
ASGV:アップルステムグルービング
CGMMV:スイカ緑斑モザイクウイルス
KGMMV:キュウリ緑斑モザイクウイルス
MNSV:メロンえそ斑ウイルス
MYSV:メロン黄化えそウイルス
ZYMV:ズッキーニ黄斑モザイクウイルス
WSMV:スイカ灰色斑紋ウイルス
SqMV:スカッシュモザイクウイルス
MiLBV:ミラフィオリレタスウイルス
TuMV:カブモザイクウイルス
CyMV:シンビジュウムモザイクウイルス
CarMV:カーネーション斑紋ウイルス
CVB:キク B ウイルス
LSV:ユリ潜在ウイルス
INSV:インパチエンスネクロティックスポットウイルス
ORSV:オドントグロッサムリングスポットウイルス
TRSV:タバコ輪点ウイルス
EAPV:パッションフルート東アジア

ウイルス　SDV:温州萎縮ウイルス

GFV:ブドウファンリーフウイルス

３）ティッシュプリント法

ティッシュプリント法は、元はウイルスの組織内の分布をニトロセルロースメンブレンに写し取って、酵素結合抗体により肉眼で観察するために開発された技術である。ELISA 法用の酵素結合抗体がそのまま利用でき、ELISA 法よりも作業性が高く簡便であることからウイルス病診断でもよく利用されている。特に TYLCV のような師部細胞にしか存在しないウイルスでは、濃度の高い師部組織でのウイルスの有無が可能である。

５．遺伝子診断

近年、多数の植物ウイルスについて、遺伝子の塩基配列情報が明らかとなってきており、先に挙げた 9 種類のトマトに発生する主なウイルスすべてについて、遺伝子増幅法による遺伝子診断が可能となっている。遺伝子増幅法には、サーマルサイクラーと言う専用の反応装置が必要な PCR 法と、65℃のインキュベーターで実施できる LAMP 法や ICAN 法がある。原理的には、いずれも微生物由来の DNA 合成酵素を用いて、増幅したい遺伝子の一部を試験管の中で繰り返し合成する技術である。増幅された DNA はアガロースゲル電気泳動により検出できるが、LAMP 法では反応液が白濁して肉眼で結果の判定が可能である。植物ウイルス用の遺伝子診断キットは、まだ多くは市販されていないので、必要な試薬類を別々に購入する必要がある。

DNA 合成酵素は、何も無いところから DNA を合成することはできない。元になる DNA にその DNA の一部と相補的に結合する短い DNA（プライマー）を加えることで、DNA 合成酵素はプライマー端から DNA を合成し始める。遺伝子増幅法による遺伝子診断のカギは、プライマーの塩基配列の選択（プライマーの設計）にある。野菜のウイルス病診断のためのプライマーについての情報は、野菜茶業研究所をはじめ、各地域の農業研究センターや都道府県の農業研究センターに照会すればよい。

植物ウイルスの多くは DNA ではなく RNA を遺伝子として有している。DNA 合成酵素は RNA を元に DNA を合成することはできないので、RNA を元に DNA を合成する逆転写酵素を利用して RNA に相補的な DNA を合成してから遺伝子診断を実施する。

9 種類のトマトに発生する主なウイルスのうち、AMV、CSNV、CMV、PVX、PVY、TSWV、ToMV の 7 種類は RNA 型ウイルスなので、遺伝子診断を行うには RNA 抽出と逆転写反応が必要である。TbLCV や TYLCV の DNA 型のウイルスでは、汁液から直接遺伝子診断が可能で、TYLCV については診断キットが市販されている（栄研科学「トマト黄化葉巻病診断キット」）。おな植物から RNA や DNA を抽出するキットは多数販売されている。

Ⅱ　ウイルス診断の実習

【LAMP 法によるトマト黄化葉巻病の診断】

LAMP（Loop-Mediated Isothermal Amplification）法を用いてトマト黄化葉巻病の病原ウイルス *Tomato yellow leaf curl virus*（TYLCV)のトマト葉からの検出を行い、本病の診断を行う。TYLCV は一本鎖の DNA をゲノムとして持ち、感染細胞中では多量のゲノム DNA を複製することより、LAMP 法ではウイルス DNA を標的として検出を行う。LAMP 法は従来の遺伝子増幅法に代わる簡易・迅速な手法である。一般に、核酸を検出して診断する場合、検定試料中の微量の核酸を増幅しなければならず、これまで PCR(Polymerase Chain Reaction)法が多用さていた。LAMP 法は、PCR 法と比較して専用の増幅装置を必要とせず、一定温度で反応が完了することより初期投資費用が抑えられるなどの利点がある。TYLCV の DNA を検出する方法として、現在(2010/9)入手可能な市販キットを用いた LAMP 法を行う。

試薬・消耗品・備品など

◆トマト黄化葉巻病診断キット（販売元：ニッポンジーン）
◆0.2mL PCR チューブ：リアルタイム検出の場合は透過性の高いチューブが必要
◆ピペットマン(200μL、1000μL)同等品
◆ピペットチップ：フィルター付推奨
◆爪楊枝（滅菌済みで十分に乾燥したもの）
◆恒温機：設定温度 60-65℃と 80℃
◆UV 照射装置

＜手順＞ 本法はキットの簡易マニュアルに順ずる

①検査反応液の調整

1）氷上にて反応液を調製し、必要なテスト数分を分注
2）反応開始まで、氷上に維持

	テスト数		
	1	5	10
ウイルス検査液	4.6μl	23μl	46μl
蛍光発色液	0.2μl	1μl	2μl
酵素液	0.2μl	1μl	2μl
合計	5μl	25μl	50μl

②サンプリングと増幅反応

1）爪楊枝にて、検定サンプルを軽く突く
2）反応液に爪楊枝の先端を軽く触れさせる
（反応液に爪楊枝を長く浸すと、乾燥した爪楊枝が反応液を吸収してしまう）
3）チューブを 63℃で反応させる(1-2 時間程度)

４）反応を停止させる場合は、80℃で加熱し酵素を失活させる（2-5 分間）

③発色反応・判定

１）UV 照射装置にて、反応チューブの蛍光を確認する

２判定

＜Tips＞

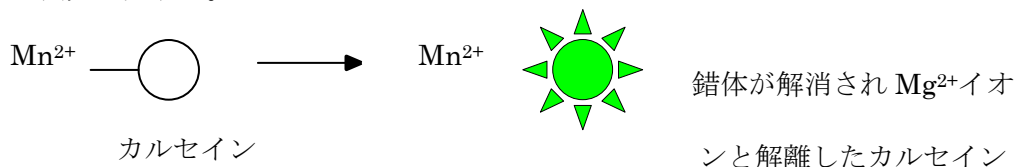
①－１）→　LAMP 法は非常に高感度な為、PCR 産物の電気泳動を行う場所等で検査反応液を調製するとコンタミネーションが起きる可能性がある。出来れば、作業区画を分けて調整。

②－４）→　反応産物はチューブのフタを開けずに、判定後に廃棄(汚染を防ぐため)

③－１）→　蛍光物質(カルセイン)の励起波長は 240-370nm と広範囲に渡るため、波長範囲の広い照射装置を用いると陰性コントロールでも蛍光が観察される(λex=325nm/λem=515nm)。キットの説明では、320nm 付近ではバックグラウンドが高いため、中波長を除く短波(240-260nm)または長波(350-370nm 付近)側の波長を使用すると、反応特異的な蛍光を観察できる。また青色 LED ライト(450nm 付近)でも励起可能であるが、同様にバックグラウンドが高い。

＜備考＞

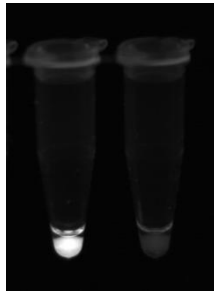
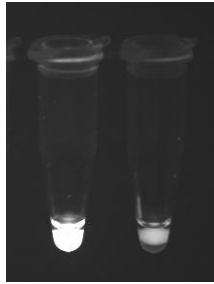
◆蛍光物質(カルセイン)

本キットには、反応産物の確認のためにカルセインが含まれている。カルセインは重金属(マンガンなど)と錯体を形成すると蛍光を消失し、錯体が解消されると蛍光を発する。

◆目視による増幅の確認

PCR 法及び、LAMP 法をはじめとする DNA 鎖を伸長・合成する酵素を用いた反応では、副産物としてピロリン酸が生成しマグネシウムと反応してピロリン酸マグネシウムが生成される。こうした反応系において、増幅産物が多量に生成されると、同じく多量のピロリン酸マグネシウムが生成することになり、溶解度積を上回った時点で沈殿を生じて、目視できるまでに白濁化する。また、ピロリン酸はマンガンとも反応し、上記の蛍光物質よりマンガンを奪い錯体解消にも働く。

◆LAMP 法の判定（異なる蛍光励起波長による見え方の違い）

予め使用する照射装置でのバックグラウンドをテストすることが望ましい。

下記の写真は陽性(+)及び陰性(-)コントロールの増幅結果を示す。

UV 照射装置
（一般的なゲル撮影装置）

青色LED 照射装置

参考文献など

植物ウイルス全般

池上正人ら著（2009）,植物ウイルス学，朝倉書店，東京，pp196

都丸敬一ら編（1983），植物ウイルス辞典，朝倉書店，東京，pp632

植物ウイルス研究所学友会編（1984），野菜のウイルス病，養賢堂，東京，pp474,

血清学的診断関係

Hampt, E.ら編（1990）, Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens - a laboratory manual, APS press, St. Paul, USA, pp389.

遺伝子診断関係

中山 広樹（1996）バイオ実験イラストレイテッド 3　本当にふえる PCR，秀潤社，東京，pp162

LAMP 法関係

トマト黄化葉巻病診断キット取扱説明書．株式会社ニッポンジーン

Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T., (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 28(12): e63.

福田至朗 ら(2005)，簡易な鋳型調製による loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法を用いたトマト黄化葉巻ウイルスの検出．関西病虫害研究会報 47：37-41.

脱臭化メチル対策技術の開発状況と課題

（独）農研機構・中央農業総合研究センター
昆虫等媒介病害研究チーム
津田新哉

はじめに

園芸作物の持続的安定生産に，土壌消毒は欠かせない。単一作物の周年栽培では，土壌病害虫による連作障害が発生するためだ。それら土壌伝染性病害虫の発生を防ぐために，生産現場では多くの消毒剤が使われている。その中で最も効果的な薬剤に臭化メチル剤がある。

臭化メチル剤は，土壌病害虫のみならず，雑草被害の防除にまで効果を示す卓越した土壌くん蒸剤として農業現場で普遍的に使用されてきた。しかし，1992 年に「オゾン層を破壊する物質に関するモントリオール議定書」第４回締約国会合において，本剤はオゾン層破壊関連物質に指定され，1995 年以降は検疫用途を除きその製造・使用が国際的に規制された。日本を含む先進諸国では，同締約国会合で承認された特別の用途（検疫用途，緊急用途，不可欠用途）を除き 2005 年に原則廃止が決定された。我が国では，その廃止期限以降，技術的・経済的代替技術が皆無であるキュウリ，メロン，トウガラシ類，ショウガおよびスイカの特定の土壌伝染病害を対象に，2002 年から都道府県を通じて不可欠用途申請の手続きを開始した。その結果，全国の約 1/3 の地方自治体から不可欠用途として本剤の継続使用の要望が寄せられ，農林水産省消費・安全局植物防疫課では 2006 年１月に「不可欠用途臭化メチル国家管理戦略」を制定すると共に，地方自治体から提出される同剤の使用要求量を年度ごとに取りまとめ国連環境計画オゾン事務局に申請してきた。

そのような状況の中， 2007 年に開催された第 27 回モントリオール議定書公開作業部会で，オゾン事務局内の評価委員会のひとつで，臭化メチルに関する技術評価を担当する「臭化メチル技術選択肢委員会（MBTOC)」により，日本の当該作物に発生する土壌病害は代替技術の導入等により対処可能であると判断され，2009 年申請分の不可欠用途用本剤は約 30％の減量査定で決議されてしまった。さらに MBTOC は，追い討ちをかけるように，先と同様の理由を堅持しながら我が国の土壌くん蒸用臭化メチルの申請は 2011 年以降認めないと一方的に勧告してきた。

我が国農業の持続的発展と国際的環境保護政策との狭間で，不可欠用途用臭化メチル剤対象作物の栽培・生産技術開発で新たな展開が求められている。

I オゾン層を取り巻く国際情勢

オゾンは自然界の大気中に存在するガスで酸素原子の三量体である。大気中のオゾン密度の濃い領域はオゾン層と呼ばれ，地上から約11km上空までの対流

圏と11kmから50kmまでの成層圏にそれぞれ10％と90％の割合で存在している。それらの内，成層圏のオゾン層は，太陽から地球に降り注ぐ生物にとって有害な紫外線(320nm以下の波長)を吸収する。この成層圏のオゾン層が減少すると，地上に到達する宇宙からの紫外線が増加し，微生物から高等動植物に至るすべての生物種で，遺伝情報が蓄積されている物質(DNA)に致命的な損傷が生じる。さしずめ，人間であれば多くの皮膚ガンが発症すると予測されている。従って，成層圏に存在するオゾン層は，地球上の全ての生命の生存に極めて重要な役割を果たしている（Fahey，2006)。

ところが，1982年，南極に駐在する日本観測隊が昭和基地上空のオゾン濃度を調査していたところ，南半球では真冬にあたる８月中旬から初春の12月上旬にかけてそのガス濃度が著しく低下している現象を世界に先駆けて発見した（Chubachi，1984）。さらに観測隊は，データを取り始めた1979年まで時間を遡り，南極上空のオゾンガス濃度が年々減少していることを明らかにした。しかし残念なことに，この発見は世界的に殆ど注目されなかった。日本観測隊の活動とほぼ同時期に，イギリスの南極観測隊も同様の現象を発見していた。ファーマンらは，イギリス観測隊が調査を開始した1958年まで遡ってデータを解析し，南極上空のオゾンガス濃度が1970年代後半から徐々に減少していること，更にそのガス濃度と大気中のフロンガス濃度との間に逆相関が認められることを示した（Farman et al.,1985）。また，アメリカ国立航空宇宙局（NASA）では，気象観測人工衛生「ニンバス７号」による解析映像を公開し南極上空のオゾンガスが希薄になっている部分を視覚的に表現した（Stolarski et al.,1986）。これが，世に言う「オゾンホール」である。これらの発表を契機として，成層圏のオゾン層保護意識が国際的に一気に高まった。因みに，NASAのウェイブサイト「Ozone hole watch」＜http://ozonewatch.gsfc.nasa.gov/>では，1979年以降のオゾンホールの変遷を動画および静止画の両方で閲覧することができる（図-1）。

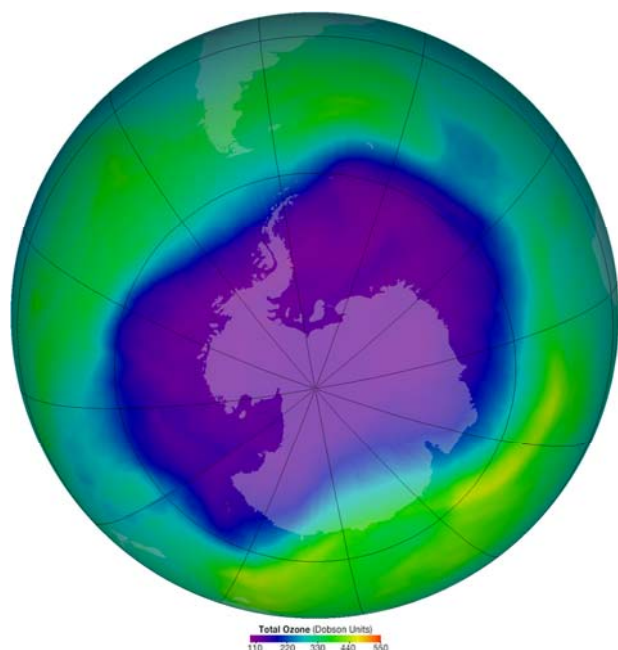



図-１　南極上空に出現したオゾンホール（2006年9月24日の観測図、NASA提供）

地球上の生物にとって危機的と

も言える上記の結果を受け，世界主要各国は，1985 年にオゾン層保護のための国際的対策の枠組みを定めた「オゾン層の保護のためのウィーン条約」（1988 年発効）を，さらに 1987 年にその条約に基づくオゾン層の破壊物質の指定，それら物質の製造，消費および貿易を規制する「オゾン層を破壊する物質に関するモントリオール議定書」を採択し，その事務局を国際連合環境計画（UNEP，本部：ケニア・ナイロビ）に設置した。ウィーン条約の締約国は，2007 年 11 月現在，190 か国および EU 諸国である。我が国では，オゾン層の破壊物質を国内で適切に取り扱うことを目的として 1988 年に「特定物質の規制等によるオゾン層の保護に関する法律」を制定してこれら一連の国際条約に批准するとともに，先進国の一員として地球環境問題に積極的に取り組む姿勢を示した。

II 臭化メチルを取り巻く国際情勢

冒頭にも記したが，臭化メチルは 1992 年にオゾン層破壊関連物質に指定され，先進国では 2005 年に原則廃止された。しかしながら，農業用の収穫物くん蒸剤並びに土壌消毒剤としての使用目的において，技術的・経済的に実行可能な代替技術が皆無の場合，当該国は不可欠用途用本剤を使用予定年の二年前から申請することができる。その際，国連環境計画オゾン事務局は MBTOC の査定を参考に各国から提出された申請量の妥当性を審議し，翌年のモントリオール議定書締約国会合で申請国の本剤の製造・使用量を決議してきた。廃止期限の 2005 年以降に本剤の不可欠用途使用を申請した先進国は，オーストラリア，カナダ，EU 諸国，イスラエル，日本，ニュージーランド，スイス，そしてアメリカ合衆国の合計 45 ヶ国であった。それらの内，スイスは 2007 年以降，ニュージーランドは 2008 年以降，EU 諸国は 2009 年以降の申請を取り止めた。また、イスラエルは 2011 年度分の申請を最後に、不可欠用途用臭化メチルの申請を取りやめると宣言した。残された４カ国の内，オーストラリアとカナダは収穫物くん蒸用とイチゴの苗育成（土壌）用として申請しているが，それらは４カ国の全申請量のそれぞれ数%程度と少量である（表-1）。

表-１　全廃期限（2005 年）以降の不可欠用途用臭化メチルの決議量（トン）

	2005年	2006年	2007年	2008年	2009年	2010年	2011年	2012年*
オーストラリア	147	75	49	48	38	36	35	36
カナダ	62	54	53	42	34	35	21	16
EU	4,393	3,537	689	245	0	0	0	0
イスラエル	1,089	880	966	861	717	291	225	0
日本	748	741	636	444	305	267	240	220
アメリカ合衆国	9,553	8,082	6,749	5,356	4,262	3,235	2,055	913
合 計	15,992	13,369	9,142	6,996	5,356	3,573	2,576	1,185

＊：2012 年分は MBTOC 勧告量（未決）

一方，アメリカ合衆国は，2011 年度の決議量では全不可欠用途用本剤の約 80％

を占める。対象農作物は，ウリ類，樹木等苗育成，花き類，ナス，トウガラシ類，トマト，ジャガイモ，サツマイモ，イチゴ苗等多岐に渡る。この国は，開発国・発展途上国が 2015 年に臭化メチル剤の原則廃止期限を迎えるにも関わらず，あくまでも強硬路線を突っ走っている。MBTOC の査定に対して一歩も引けを取らず，独自の判断基準で算出した要求量を主張しながら同議定書公開作業部会等の国際会議で対決姿勢を示している。

III 臭化メチルに関する我が国の対応

我が国の 2011 年度分の不可欠用途用臭化メチル剤の決議量は，各国から申請された全要求量の約 9.3％である（239.746 トン）。我が国が申請する対象作物とそれぞれの決議量は，クリの収穫物くん蒸用として 5.35 トン，土壌消毒用としてキュウリの 27.621 トン，メロンの 73.548 トン，スイカの 13.05 トン，トウガラシ類の 65.691 トン，そしてショウガの 54.486 トン（露地・施設の合計）である。

臭化メチルがオゾン層破壊物質に指定された 1992 年以降の我が国では，モントリオール議定書の取り決めに従い，1991 年の臭化メチル剤消費数量（6,107 トン）を基準として 1995 年の生産量・消費量を凍結し，1996 年から基準年に対して毎年 5％ずつ削減してきた。さらに，1999 年以降は同議定書が定めた削減スケジュールに従ってその使用量を極端に減らし，検疫用途，不可欠用途を除いて 2005 年に原則廃止した。原則廃止期限以降の始めの二カ年（2005 年，06 年）は，我が国が要求する不可欠用途での申請量がほぼ全量認められていたが，2007 年では約 86％，2008 年以降は，事前協議なしに，最大削減率となる約 30％減の決議を毎年突き付けられる状況となった（図-2）。最も憂慮すべきは，2009 年分の申請量を審議した 2007 年の第 27 回モントリオール議定書公開作業部会である。農水省植物防疫課では，地域農政局・地方自治体を通じて生産者の要求実態を詳細に集計し，さらに MBTOC が指導する環境への同剤放出抑制技術の生産現場への導入実績も示しながら，綿密な積算基礎の基に申請書を仕上げオゾン事務局に提出した。それにも関わらず,MBTOC は 2009 年分の勧告量について，申請書の内容を全く吟味せずに，前年度分決議量の約 30％減と一刀両断に切り捨てた。さらに追い討ちをかけるように，日本が申請する土壌用不可欠用途臭化メチルは 2011 年で全廃とする一方的な勧告を突き付けて

図-2　日本の全廃期限（2005 年）以降における不可欠用途用臭化メチルの申請量と決議量の変遷
2012 年の決議量は勧告量である（未決）。

きた。これは，本剤の使用を申請している各産地の現状を完全に無視した暴挙であると言わざるを得ない。その主たる理由は，「日本は代替技術開発の能力があり，それら開発する技術を産地へ普及させることにより当該病害の対処は可能である」との事であった。

日本国政府は，そのような一方的な全廃期限の設定は本剤申請産地に混乱を招くと判断し強く抗議した。その結果，日本の全廃期限は，代替技術の開発状況とその普及の可能性等を踏まえながら我が国自らが主体的に策定することで合意が得られ，MBTOC が示した 2011 年を全廃期限とする勧告案は撤回された。これを受け，農水省植物防疫課は独立行政法人研究機関および都道府県の病害虫防除技術の専門家による「不可欠用途用臭化メチル技術検討会」において代替技術開発の進展程度を見越した削減計画案を策定し，それをもって土壌用の不可欠用途用臭化メチル剤を使用している地方自治体，生産者，産地関係者，さらに農薬関連団体と協議を重ねた。その結果，2008 年 3 月に行政部局や関係団体で構成される「臭化メチル削減対策会議」において土壌消毒用本剤の完全撤廃期限を 2012 年末日と定めた我が国独自の削減計画「不可欠用途臭化メチル国家管理戦略」改訂版を確定し，同年 4 月に国連オゾン事務局に提出した。

ところが，不運はさらに続いた。先述の通り，土壌消毒用本剤の全廃期限を 2012 年末日と定めた我が国独自の削減計画を提示したにも関わらず，MBTOC は 2010 年度分申請についても，前年度と同様に 2009 年度分決議量の約 30%減を勧告してきた。MBTOC での査定は，当該年度の申請内容の十分な精査により実施されることになっているが，我が国に対する 2008 年からの三年間の審査結果を見る限り，前年度決議量に対して機械的に 30%減を被せているようにしか思えなかった。そこで 2008 年 7 月に開催された第 28 回モントリオール議定書公開作業部会では，筆者も含めた日本政府代表団を組織し，MBTOC と直接交渉する二者会合を開催した。

二者会合では，(1)我が国の土壌用臭化メチル剤対象作物は単一周年栽培で，生産，流通さらに市販まで特化されたシステムにより形成されていることから他作物への転作あるいは輪作は困難であること，(2)現段階で実行可能な代替技術は既に導入されていること，(3)各産地の社会的・地理的理由により本剤しか利用できないこと，(4)我が国では，2012 年末日を全廃期限とする改訂「不可欠用途臭化メチル国家管理戦略」を提出し，それまでの期間で計画的に代替技術体系の開発を実施する予定であること，の 4 つを理由に交渉した。その結果，日本の産地が抱える特殊事情や代替技術の進捗状況の詳細が MBTOC 側に理解され，2008 年 8 月下旬までに 2012 年末日全廃に向けた削減計画を示し，再協議することで合意に至った。その結果,2010 年度分の臭化メチル剤は申請量の約 7.5%減の 276 トンが認められることになった。

IV 今後の我が国の歩むべき道

我が国の土壌用臭化メチル剤の使用期限は，産地，関係者との合意の基で我が国独自の方針として 2012 年末日に設定された。既に，賽は投げられた。しか

し，MBTOC は，2015 年から始まる開発国・発展途上国での臭化メチル剤削減プログラムを目前にして，先進国での不可欠用途用本剤の使用を一刻も早く全廃に追い込みたい構である。従って，日本との今後の交渉においても，国内の代替技術開発が少しでも停滞すれば「真剣な取り組みがなされていない」ということを理由に，2013 年以前の段階で全廃期限を設定する恐れがある。まだ予断を許さない状況である。

そのような中，MBTOC の厳しい審査を受けながら我が国の思惑通りのシナリオを展開するためには，今まで以上に代替技術の開発事業に真摯に取り組む姿勢を示すしか道は残されていない。MBTOC は，2009 年までの我が国の状況を必ずしも好意的には見てこなかった。その姿勢が，2008 年以降に決議された機械的な対前年決議量の約 30％削減に表れている。残された期間，我が国の代替技術の開発状況の詳細を具に報告し，両者の認識の間に齟齬が生じないようにすることが，日本の申請量を全量確保する重要な要因になると予想される。我が国では，これまでに農水省所管独立行政法人研究機関並びに地方自治体農業試験研究機関等を中心として，不可欠用途臭化メチル剤対象の土壌病害防除技術を少なからず開発してきた。それらは，(1)発病の原因となる前作物の除去と発病個体の速やかな撤去などの圃場衛生管理，(2)種子管理の徹底による病原ウイルス持込の排除，(3)抵抗性品種の導入，(4)蒸気消毒等の物理的防除技術の導入，(5)苗のジフィーポット等への植付けによる根の汚染土壌への接触防止と定植時の根からの病原ウイルス感染防止，(6)土を使わず，籾殻，ヤシガラ，樹皮，ロックウールなどを用いる簡易基質栽培や隔離床栽培，(7)代替化学薬剤の利用等，である。これら個々の技術は，単独では不十分な効果，あるいは経済的に実効性を伴わない技術であったりと，現在の生産現場では必ずしも即戦力として利用されてはいない。しかしこれらは，複数の個別技術の体系化，あるいは経費削減のための新たな改良を施すことにより，実行可能な技術に仕上げられる可能性を秘めている。

このような国際的背景，社会的情勢を受けて，2008 年度から開始した農林水産省の「新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業」において，筆者の研究機関を中心にその他 15 研究機関が参画する「臭化メチル剤から完全に脱却した産地適合型栽培マニュアルの開発」の研究プロジェクトが 5 年計画で動いている。この研究プロジェクトでは，現在の生産地で慣行となっている臭化メチル剤を利用した栽培歴に取って代わり，上記の個別技術の体系化，あるいは新規個別技術の開発に取り組みながら 2013 年以降に実効性ある脱臭化メチル栽培マニュアルを新規に開発することを目的としている。先述したとおり，我が国に対して臨戦態勢をとっている MBTOC は，この研究プロジェクトの進捗状況如何によっては 2013 年を待たずして厳しい裁定を下すかも知れない。我々にとっては極めて責任の重い研究プロジェクトである。我が国が思い描く 2013 年以降の脱臭化メチルの完全撤廃構想を見事にソフトランディングさせるためにも，本プロジェクトに参画する研究者は最大限の努力を払う必要があろう。

おわりに

近年の地球環境保護意識の高まりは全世界的である。国連環境計画に事務局を置く種々の国際条約の中で，オゾン層を保護するウィーン条約さらにオゾン層破壊物質の規制方針を定めたモントリオール議定書は最も成功している国際条約のひとつである。温室効果ガスを規制する京都議定書は，各国の足並みが揃わず，同ガスの減少どころか逆に増加が指摘される始末である。そのことからも，モントリオール議定書の確実な進展程度の高さが伺える。しかし一方，オゾン層破壊物質のひとつである臭化メチル剤に大きく依存してきた我が国の5作目産地においては，ただならぬ事態に陥っていることも事実である。農家の不安を解消し，地球環境保護に貢献するためにも先に紹介した新規研究プロジェクトの果たす役割は大きい。その研究プロジェクトで開発される 5 作目の新規栽培マニュアルは何れも臭化メチル無き後の当該作物生産を支える栽培マニュアルの骨格となる。不可欠用途用臭化メチル剤を利用している地域の生産者，農業関係機関，行政・普及部局さらに試験研究機関の間で交わされる真剣な議論が，当該作目産地の今後の歩むべき道を創っていくであろう。

引用文献

1) Chubachi S. (1984): Memoirs of National Institute of Polar Research. Special issue 34: 13～19.
2) Fahey D.W. (2006): Report of the 2006 Assessment of the Scientific Assessment Panel. Twenty Questions and Answers about the Ozone Layer: 2006 Update. United Nations Environment Programme. Ozone Secretariat <http://ozone.unep.org/Assessment_Panels/SAP/Scientific_Assessment_2006/index.shtml>
3) Farman J. C. et al. (1985): Nature 315: 207～210.
4) Stolarski R. S. et al. (1986): Nature 322: 808～811.

生物機能を活用した土壌消毒
－土壌消毒をめぐる最近の話題－

千葉県農林総合研究センター
病害虫防除課　　　植松清次

はじめに

わが国では、連作に伴って発生する土壌病害虫を防除するため、臭化メチルやクロルピクリン等による土壌くん蒸消毒が広く普及した。特に、臭化メチル剤は、トマト、メロン、キュウリ等の施設園芸における集約的生産体系を支えてきた。しかし、臭化メチルは 1992 年第 4 回モントリオール議定書締約国会合において、オゾン層破壊物質として指定され、1997 年の第 9 回モントリオール議定書締約国会合において、代替不可能な一部の用途（不可欠用途）を除いて 2005 年に使用が禁止された（表 1、表 2）。2008 年になり、わが国は UNEP（国連環境計画）の下部機関である TEAP（技術・経済評価委員会）、 MBTOC（Methyl Bromide Technical Options Committee：臭化メチル技術選択肢委員会）に対し、「臭化メチルの不可欠用途全廃のための国家管理戦略」を提示し、2013 年に不可欠用途用臭化メチルを全廃するとになった。

現在、代替技術としてヨウ化メチル等の代替薬剤の開発、クロルピクリンのフロー剤化（化学的防除）、太陽熱や熱水、蒸気による消毒（物理的防除）、生物農薬や拮抗微生物の探索・導入（生物的防除）、病害性抵抗性品種、抵抗性台木の導入、完熟堆肥の施用、菌根菌の接種および輪作（耕種的防除）の単用あるいは組み合わせなどの開発と普及が進められている（西，2006）。しかし、これらの代替技術は臭化メチルに比較して十分な消毒効果が得られているとは限らない。クロルピクリン剤は代替剤と広く普及しているが、刺激臭が強いため使用者への危害や、混住地帯での土壌消毒でしばしばトラブルとなっており、使用がかなり制限されている。

近年、代替技術としてバイオフューミゲーションや生物的土壌消毒、土壌還元消毒等の生物機能を活用した土壌消毒が研究が盛んに行われ、普及技術となったものもある。ここでは、こうした取り組みを中心に紹介する。

１．臭化メチル代替化学農薬

MBTOC で話題となった臭化メチル代替化学農薬は下記のとおりである(田代, 2006；西, 2006)。

(１) クロルピクリン：有力な臭化メチル代替剤である。フロー剤はイタリア、米国、日本で登録がある。米国などでは広範囲の圃場で処理する場合、地域住民や環境に対する影響評価が話題となっている。

(２) ホスチアゼート：センチュウ類や土壌害虫に有効である。

(３) シアン：オーストラリアでイチゴやニンジンの糸状菌病や雑草に対する代替技術として評価されている。

(４) Dazitol：米国で登録されているが試験例は少ない。トウガラシから抽出したキャプサ

イシンとカラシナ種子から抽出したアリルイソチオシアネートが主成分である。トマト、キュウリ、メロンやシバの土壌病害虫に有効との試験例あり。代替剤としての評価のためには、より多くの試験例が必要である。

(５) D-D ＋クロルピクリン：オーストラリアやスペインではイチゴで利用。フロー剤が米国で登録されている。米国などでは広範囲の圃場で処理する場合、地域住民や環境に対する影響評価が話題となっている。

(６) カーバム・ダゾメット(MITC とその関連剤)：土壌病原菌と雑草の双方に効果があるが、効果の安定性確保のための処理方法の改善が必要である。他剤との組み合わせ処理技術の開発が進んでいる。

(７) ヨウ化メチル：臭化メチルと同様の効果を示す。オゾン層破壊に及ぼす影響は、非常に低い。日本では 2009 年に農薬登録（商品名：ヨーカヒューム）された。現在、メロン、トマト、キク及びカーネーションの数種土壌病害虫に適用がある。

http://www.agriculture.jp/agr/ApplicationsListByRegistration.seam

(８) ジメチルジスルフィド：フランスやイタリアで検討が進む。糸状菌や線虫に効果があるが、臭メチル代替剤としての評価にはさらなる検討が必要とされている。

(９) プロピレンオキサイド：病原菌や雑草に効果。さらなる検討が必要であるという。

(10) アジ化ナトリウム：米国で検討が進む。糸状菌、線虫、雑草に有効。ハマスゲの一種(Nutsedge) やネグサレセンチュウに対する効果は不十分である。

(11) スルフリルフロライド：土壌病原菌や線虫に対する効果を確認。さらなる検討が必要であるという。

２．農薬に依存しない代替技術

MBTOC で話題となった化学農薬以外の代替技術は以下のとおりである[西(2006)を改変]。

(１) 熱水土壌消毒・蒸気消毒：蒸気消毒はオランダの花き栽培では約 50%が利用しているという。日本では、温室メロンやカーネーション栽培などで古くから普及している。近年オランダとイスラエルで 800 ℃以上の熱風を用いて土壌消毒を行う機械が開発された。この機械は 250m の長さの畦を 1 時間で処理する能力を持つという。熱水土壌消毒は日本で開発され、普及が始まっている(Kita, et al. 2003 ; Uematsu, S. et al. 2003 ; 北, 2006) 。

(２) 太陽熱土壌消毒：イスラエルの Katan ら(1976)や奈良県の児玉ら(1978)によって開発された技術である。夏季高温になるような気候と栽培条件に恵まれた国々で、その利用が拡大しつつある。カーバムナトリウム塩と併用すると、その効果はより安定するという。近年アメリカでは、育苗用土の消毒に太陽熱を利用するシステムを開発しているという。

(３) バイフューミゲイション：単独では十分な効果は出ないが、薬剤と併用することにより、必要な薬量の削減が可能という。本法では、植物の分解過程で生ずる揮発性物質あるいは根から直接分泌される揮発性物質を利用する。土壌病害、害虫、線虫防除に効果がある(後述)。

(４) 生物防除：海外では *Trichoderma* 属菌を土壌処理する方法が実用化されている。日本

でもトリコデルマアトロビリデ水和剤(エコホープ)、アグロバクテリウムラジオバクター剤(バクテローズ)、非病原性エルビニアカルトボーラ水和剤(バイオキーパー水和剤)、シュードモナスフルオレッセンス剤(セル苗元気)、非病原性フザリウムオキシスポラム水和剤(マルカライト)などが開発されている。

(５) 少量培地：施設栽培で普及が始まっている。初期投資が必要である。少量土壌の消毒には蒸気消毒が対応可能である。

(６) 接ぎ木(抵抗性台木)：世界各地で普及が始まっている。米国では接ぎ木技術の開発が始まっている。

(７) 抵抗性品種：世界各地で採用されている。特にトマトとメロン、トウガラシ類で抵抗性品種の開発例が多い。

３．生物機能を活用した土壌消毒(広義の生物的土壌消毒)

竹原(2008)は、(狭義の)生物的土壌消毒法(Biological Soil Disinfestation ; Blok ら, 2000 ; Goud ら, 2004)やバイオフューミゲーション、還元土壌消毒、嫌気的土壌消毒等の生物的プロセスを含む作用機構によって、作物栽培前に土壌病原菌の密度や活性を低下させる手法を（広義の）「生物的土壌消毒法」と呼び、熱などによる物理的土壌消毒や化学的土壌消毒に対する土壌消毒法である。しかし、この呼び方は、Blok らの(狭義の)生物的土壌消毒法と紛らわしいので、ここでは「生物機能を活用した土壌消毒」と呼称することにしたい。

(１) バイオフューミゲーション　Biofumigation

アブラナ科植物を土壌に鋤き込むと、後作の土壌病害が軽減される現象が古くから知られている(國安， 1989)。近年、この方法はオーストラリア連邦科学産業研究機構(Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation)の J. A. Kirkegaard らによって、バイオフューミゲーション(Biofumigation：生物的くん蒸)と呼ばれるようになった(Kirkegaard and Sarwar, 1998 ; Sarwar and Kirkegaard, 1998 ; Morra and Kirkegaard, 2002)。カラシナなどアブラナ科植物に含まれるグルコシノレート(カラシ油配糖体の一種)が土壌中で分解されて生じるアリルイソチオシアネート(AITC)などのイソチオシアネート類(揮発性抗菌物質)とその他の硫黄関連化合物が、土壌中の病原菌の密度低下や活性低下に関与していると考えられている(Brown and Morra, 1997)。

竹原ら(1996 ; 2004 ; 2007)は、コマツナなどのアブラナ科植物を鋤き込むことにより、後作のハクサイ黄化病、ホウレンソウ萎凋病などの土壌病害が軽減される現象を認めている。

(２) Blok らの狭義の Biological Soil Disinfestation(BSD)

オランダ ワーゲニンゲン大学の Blok らは、牧草などの新鮮有機物(4 ～ 5t/ha)を鋤き込んで湛水を行い、気密性の高いシートで被覆し還元状態にする土壌消毒法を開発した(Blok et al., 2000 ; Goud et al., 2004)。この方法は、(1)比較的低温条件で行える、(2) 7 ～ 10 月(3 ～ 4 か月間)と長期間処理する、(3)50 ～ 70mm 程度の湛水量で、それほど多くない、(3)気密性のシートで酸素の流入を防ぐことによって還元状態を維持するなどが、後述する土壌還元消毒と異なる。

(３) 土壌還元消毒(還元土壌消毒、Reductive Soil Disinfestation)

Okazaki(1985)は、3%ショ糖液 1ml を 1g の土壌と混和し 28 ℃下に置くと、酸化還元電

位が著しく低下し、ダイコン萎黄病菌の密度を低下させることをみいだした。新村らは、フスマなどの比較的分解しやすい有機物を用いた土壌還元消毒(RSD) を開発した(新村ら, 1999 ; 新村, 2000 ; 2004)。この方法は、土壌にフスマや糖蜜等の易分解性有機物を混和し、圃場容水量以上に湛水後、土壌表面を透明フイルムで約 1 か月被覆することにより、土壌を強制的に還元状態とするものである。太陽熱消毒は約 2 か月夏季にハウスを密閉し、地温をできるだけ 40 ℃以上にするのが好ましいが、本法では 35 ℃程度の温度で約 1 か月で土壌病原菌を死滅させることを明らかにした。わが国で多くの土壌病害に対し適用が試みられ、各地で普及が始まっている(竹内, 2004 ; 渡辺・田畑, 2004 ; 牛尾ら, 2004 ; 片瀬ら, 2002 ; 渡辺, 2006 ; 久保・片瀬, 2007)。　還元状態で土壌中では酢酸や酪酸などが生成され、これら抗菌性物質により病原菌密度の低下やセンチュウ類の死滅を引き起こしていると考えられている(Okazaki and Nose, 1986 ; 片瀬ら, 2002 ; 久保ら, 2005 ; 久保・片瀬, 2007 ; Momma et al., 2006 ; Momma, 2008, Katase et al., 2010)。また、クロストリジウム(*Clostridium*)属菌が関与しているとの指摘もあり(門馬ら, 2007 ; Momma, 2008)、未解明部分が多い。

なお、Sheman ら(2007)は RSD と BSD は嫌気的条件下で行われる土壌消毒なので、一括して anaerobic soil disinfestation(ASD ; 嫌気的土壌消毒)と呼称することを提案をしている。

(４) 低濃度エタノール土壌消毒

低濃度エタノールを用いた土壌消毒技術は、エチルアルコール(エタノール)を水で 1v/v %程度に薄めて、灌水装置により畑土壌が湛水状態になるまで処理した後、農業用ポリエチレンフィルム(農ポリ)で土壌表面を 2 ～ 3 週間程度被覆するという低コストで簡便な技術である。処理方法は、液肥混入器と潅水チューブを利用して、水とエタノールを混合しながら処理可能である。処理中には 30 ～ 35 ℃の温度が必要であるが、さらに高温域で防除効果が高まる。

この方法により、ホウレンソウ萎凋病、サツマイモネコブセンチュウなどの土壌病害虫や雑草に、十分な防除効果が得られている(植松, 2007 ; Uematsu, 2007)。

土壌還元消毒では、フスマを処理した土壌層では防除効果が優れ、フスマが鍬込まれない下層では効果が低下することが知られているが、エタノールの場合は、深層に分布する土壌病害虫に有効であることが期待できる。

本技術を適用することで、(1)土壌中の環境が酸化(好気的)状態から還元(嫌気的)状態に変化すること、(2)酢酸などの有機酸濃度が増加することなどが要因として考えられる(Kobara et. al, 2007 ; 2008 ; 小原ら, 2008)。いずれにせよ、詳細な生物機能的メカニズムの解明が今後必要であり、その知見に基づいた土壌消毒法の確立が必要である。

原料アルコール(約 90v/v%)は、米国、ブラジル、タイ、インドネシア、中国等から、年間約 360 千 kL が輸入され、価格は 50 ～ 60 円/L である。この原料アルコールを使用した場合に、1v/v%エタノールを 100L/m^2 の処理量で処理すると仮定した場合に、エタノール資材の費用は、60,000 円/10a である。

(５) その他の事例

湛水もしくは田畑輪換による病害虫防除の試みが古くから行われている。こうした防除効果は、湛水条件下で、土壌微生物によって惹起される土壌の低酸素化や還元化が関与し

ていると考えられる。Stover ら(1953, 1954, 1956)は，*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* により引起こされるバナナのパナマ病を湛水によりほぼ完全に防除できることを示した。また，ダイズ紫斑病（豊川ら，1966），ダイズ白絹病（仲川，1999），コムギ立枯病（埼玉県農業試験場, 1968），コンニャク白絹病（牧島, 1974）、ジャガイモそうか病(仲川ら, 2006)、イチゴ萎凋病(Ebihara et al., 2009 ; 海老原・植松 2010)などは田畑輪換により発生が軽減することが知られ，各種土壌伝染性病害の対策に用いられている。

不熟有機物や植物残さを鍬込んで防除する試みもある。ダイズ白絹病やジャガイモそうか病(仲川ら, 1999, 2006)、ナス青枯病(峰村・野村, 2004)などでは、湛水と有機物との組み合わせで防除効果が認められている。1/10,000a ワグネルポットに米ぬか 3t/10a に水 50ml を土壌混和処理し、25 ℃下でサツマイモネコブセンチュウが低下する(田場・諸見, 2007)。ダイコンバーティシリウム黒点病では、マリーゴールド(堀田，2008)やアメリカフウロ(大城, 2008)、エンバク野生種(*Avena strigosa*)(小松・山下, 2008)の鍬込みで微小菌核の密度低下が認められている。

太陽熱土壌消毒を行う際に、稲わらなどの不熟有機物を土壌に混和すると、殺菌効果が高まることが知られている(児玉ら，1978)。また、ダイコン萎黄病の罹病残さの滅菌するために、残さをビニール袋に入れ密封して、陽光下に放置して、嫌気的発酵させると、萎黄病菌(*F. oxysporum* f sp. *raphani*)が不活化することを見出し、さらに、残さ中に生成される酢酸等の抗菌性物質の関与を示唆した(萩原・国安, 1988；萩原・竹内, 1982；萩原・竹内, 1993；萩原ら, 1984)。

４．おわりに

バイオフューミゲーションは鍬込んだ植物体から発生する揮発性抗菌物質を利用することによって、また、その他の方法では、土壌中へ有機物を施用することで生じる生物的プロセスを利用することによって土壌消毒を行う技術である。これらの技術は、環境への負荷が小さく、安全性の高い技術であると考えられる。しかし、生物機能を活用する技術であるので、防除効果を高めるには、検討しなければならないことが多く残されている。例えば、防除効果に関与する微生物の特定、地域や季節、土壌の違いで防除効果に差があるか、被覆資材、処理する量、処理量の至適化、処理方法の検討、防除・作用機構の解明、適用できる作物と病害虫とその効果の確認と実証、土壌消毒から収穫まで、さらに次作への効果の持続性の評価、薬害の確認等、実用化までに多くの課題が残されている。

最後に、本文を作成に当たり、西 和文および竹原利明両博士に資料提供や指導・協力をいただいた。ここに深く感謝申し上げる。

主な参考文献

Auger, J., Arhault, I., Diwo-Allain, S., Ravier, M., Molia, F. and Pettiti, M. (2004). Insecticidal and fungicidal potential of Allium substances as biofumigants. Agroindustria Vol. 3 (3) (Proceedings of the First Intemational Biofumigation Symposium):367-370.

Bending, G. D. and Lincoln, S. D. (1999). Characterisation of volatile sulphur-containing compounds produced during decomposition of *Brassica juncea* tissues in soil. Soil Biol. Biochem 3l:695-703.

Blok, W. J., Lamers, J. G., Termorshuizen, A. J. and Bollen, G. J. (2000). Control of soilborne plant pathogens by incorporating fresh organic amendments followed by tarping. Phytopathlogy 90:253-259.

Brown, P. D. and Morra, M. J. (l997). ControL of soil-borne plant pests using glucosinolate-containing plants. Advances in Agronomy 6l:167-23 1.

Ebihara, Y., Uematsu, S. and Nomiya, S.（2009）. Control of Verticillium dahliae at a strawberry nursery by paddy-upland rotation.ournal of General Plant Pathology76.7-20 20010.2.

海老原克介・植松清次（2010）. 育苗圃の田畑輪換によるイチゴ萎凋病の防除. 植物防疫. 64:665-669.

Elsden, S. R., Hilton, M. G., Waller, A. M. (1976). The end products of the metabolism of aromatic amino acids by *Clostridia*. Arch. Microbiol. 107:283-288.

藤井義晴(2003). ヘアリーベッチの他感作用と農業への利用および作用成分シアナミドの発見.農業およ園芸 78(9):14 － 22.

藤原伸介・吉田正則(2000). 被覆植物ヘアリーベッチのアレロパシーとマルチ資材としての利用に関する研究.四国農試報 65:17 － 32.

Goud, J. C., Termorshuizen. A. J., Blok, W. J., and van Bruggen, A. H. C. (2004). Long-term effect of biological soil disinfestation on Verticillium wilt. Plant Dis, 88:688-694.

萩原　廣・国安克人 (1988). 土壌中密封埋設法によるダイコン萎黄病り病残さ処理における処理期間.日植病報:370(講要).

萩原　廣・竹内昭士郎 (1982). 確病残さの好気的または嫌気的発酵処理によるダイコン萎黄病菌の不活化.日植病報:48:688-690.

萩原　廣・竹内昭士郎 (1983). 罹病残さの嫌気的発酵によるダイコン萎黄病菌の不括化に対する発酵時の温度の影響.日植病報 49:713-715.

萩原廣・矢野昌充・坂本登・竹内昭士郎 (1984). 嫌気的発酵を行ったダイコン萎黄病罹病遺体中の有機酸含量と本病菌不括化との関連. 日植病報 50:388-389(講要).

堀田光生 (2008). マリーゴールドを利用した青枯病の防除.日植病報 62:87-89.

家村浩海・栗山雅夫 (1987). 太陽熱利用による水田転換畑露地野菜の土壌病害防除技術.昭和 61 年度実用化技術レポート No.146, 農林水産技術会議事務局, 165-186.

一色賢司・徳岡敬子 (1993). アリルイソチオシアネートによる食品の健全性確保.食品と微生物 10：l-6.

Jensen, M. T., Cox, R. P. and Jensen, B. B. (1995). 3-Methylindole (skatole) and indole production by mixed populations of pig fecal bacteria. Appl. Environ. Mcrobiol. 61: 3180-3184.

Kamo, T., Hiradate, S. and Fujii, Y. (2003). First isolation of natural cyanamide as a possible allelochemical from hairy vetch Vicia villosa. J. Chem. Ecol 29:275-283.

Katase, M., Kubo, C., Ushio, S., Ootsuka, E., Takeuchi, T. and Mizukubo, T. (2009). Nematicidal activity of volatile fatty acids generated from wheat bran in reductive soil disinfestations Nematological Research 39:53-62.

片瀬雅彦・渡辺一・市東豊弘・久保田祥子・上遠野富士夫 (2005). 土壌還元消毒によるネグサレセンチュウ類の防除効果及び施設イチゴへの適用. 千葉農総研報 4:117-123.

片瀬雅彦・牛尾進吾（2010）. 土壌還元消毒における有機酸の生成と殺線虫効果. 植物防疫 64:569-564.

Kirkegaard, J. A. and Sarwar, W, M. (1998). Biofumigation potential of brassicas. 1. Variation in glucosinolate prorfiles of diverse field-grown brassicas. Plant and Soil 201:71-89.

Kita,N., Nishi, K. and Uematsu. S. 2003. Hot water treatment as a promising alternative to methyl bromide. Proceedings of 2003 International Research Conference on Methy Bromide Alternatives and Emissions Reductions:26.1-26.3

北 宜裕 (2006). 物理的消毒法の効果と普及. 野菜茶業研究集報 3:7-16.

Kobara, Y., Uematsu, S., Tanaka-Miwa, C., Sato, R. and Sato. M. (2007). Possibilty of the new soil fumigation technique with ethanol solution. Proceedings of 2007 Annual International Research Conference on Methy Bromide Alternatives and Emissions Reductions:74.1-74.2

小原裕三・植松清次･田中千華・佐藤理恵子・佐藤充克. (2008). 低濃度エタノールを用いた新規土壌消毒法の開発. 農林水産技術研究ジャーナル 31(3):15-20.

小原裕三 (2007). 低濃度エタノールによる新規土壌消毒法の開発. 植物防疫 62:427-432.

Kobara, Y., Yogo Y. and Uematsu S. (2008). Temperature dependency of soil disinfection with low concentration of ethanol. Proceedings of 2008 Annual International Research Conference on Methy Bromide Alternatives and Emissions Reductions:107.1-74.2

小松　勉・山下　茂 (2008). 緑肥作付けによるダイコンバーティシリウム黒点病の抑制効果. 平成 21 年日植病大会講要予稿集:6l.

久保周子・片瀬雅彦・牛尾進吾・大塚栄一・山本二美・竹内妙子 (2002). 還元消毒法の消毒効果に関与する要因. 日植病報 68:206.

久保周子・片瀬雅彦・清水喜一・加藤浩生・竹内妙子 (2004). トマト土壌病害虫に対する土壌還元消毒の効果. 千葉農総研研報 3:95-104.

久保周子・牛尾進吾・片瀬雅彦・竹内妙子 (2005). 土壌還元消毒効果に関与する要因の解析. 平成 17 年日植病報大会講要予稿集:56.

久保周子・片瀬雅彦 (2007). 土壌遭元消毒の効果と普及. 植物防疫 61:68-72.

國安克人 (1989). アブラナ科作物青刈栽培による土壌病害防除.農業および園芸 64:955-959.

草川知行・平舘俊太郎・藤井義晴・高崎 強 (2000). カラシナ(*Brassica juncea* Cross.)由来の揮発性物質による雑草の発芽抑制. 千葉農試研報 41：29-34.

Matthiessen, J.N., Warton, B., Shackleton, M_A. (2004). The importance of plant maceration and water addition in achieving high *Brassica*-dedved isothiocyanate levels in soil. Agroindustria. 3:277-280.

Mayton, H.S., Olivier, C., Vaughn, S. F. and Loria, R. (l996). Correlation of fungicidal activity of *Brassica* species with allyl isothiocyanate production in macerated leaf tissue. Phytopathology 86: 267-277.

Messiha, N. A. S., van Diepeningen, A. D., Wenneker, M., van Beuningen, A. R., Janse, J. D., Coenen, T. G C., Termorshuizen, A. J., van Bruggen, A. H. C. and Blok, W. J. (2007). Biological Soil Disinfestation (BSD), a new control method for potato brown rot, caused by

Ralstonia solanacearum race 3 biovar 2. Europ. Jour. Plant Pathol. l17:403-415.

峯村　晃・野村康弘(2004).湛水還元処理によるナス青枯病および雑草への影響.関西病虫研報 466:61-62.

Momma, N., Yamamoto, K., Simandi, P. and Shishido, M. (2006). Role of orgaJlic acids in the mechanisms of biological soil disinfestation(BSD). J. Gen. Plant Pathol. 72:247-252.

門馬法明・宇佐見俊行・宍戸雅宏 (2007). 土壌還元消毒効果を示す *Clostridium* sp.の検出と還元土壌から発生する気体のトマト萎凋病菌および青枯病菌の抑制効果.土と微生物 61:3-9.

Momma, N. (2008). Biological soil disinfestatjon (BSD) of soilborne pathogens and its possible mechanisms. JARQ 42:7-12.

Noriaki Momma, Mari Momma and Yuso Kobara（2010）. Biological soil disinfestation using ethanol: effect on Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici and soil microorganisms. Jour. General Plant Pathology 76:336-344.

Morra, M. J. and Kirkegaud, J. A. (2002). Isothiocyanate release from soil-incorporated *Brassica* tissues. Soil Biol. Biochem. 34:1683-1690.

仲川晃生(1999). ダイズ白絹病の湛水による防除.今月の農業 3 月号:96-98..

仲川晃生・中村吉秀・菅　康弘・迎田幸博 (2006). 土壌の湛水化がジャガイモそうか病の発生に及ぼす影響.関東東山病虫研報 9:23-28.

西　和文 (2006). 臭化メチルを巡る国際動向と代替技術. 野菜茶業研究集報 3:35-42.

Okazaki, H. (1985). Volatile(s) from glucose-amended flooded soil influencing survival of *Fusarium oxusporum* f. sp. *raphani*. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 51:264-271.

Okazaki, H. and Nose, K. (1986). Acetic acid and n-butyric acid as causal agents of fungicidal activity of gJucose-amended flooded soil. Ann. Phytopathol. Sac. Jpn. 52:384-393.

大城　篤 (2008). アメリカフウロを利用した青枯病の防除. 植物防疫 62：90-95.

Rosenberger, R. F. (1959). Obligate anaerobes which form skatole. J. Bacteriol. 77:517.

Sarwar, M., and Kirkegaard, J. A. (1998). Biofumigation potential of brassicas. II. Effect of environment and ontogeny on glucosinolate production and implications for screening. Plant and soil. 201:91-101.

佐藤紀男(2006)米糠、菜種油粕の表面散布による除草を行ったときの水田土壌の変化.平成 17 年度研究成果情報(東北農業):43-44.

Shennan, C., Muramoto, J., Bolda, M., Koike, S. T., Daugovish, O., Rosskopf, E., Kokalis-Burelle, N. and Klonsky, K. (2007). Optimizing anaerobic soiJ disinfestation : an altenative to soil fumigation? Proceedings of 2007 Annual Intemational Research Conferrence on Methy Bromide Alternatives and Emissions Reductions : 40. 1-40.4.

新村昭憲・坂本宣・阿部秀夫 (1999). 還元消毒法によるネギ萎凋病の防除. 日植病報 65:352 (講要).

新村昭恵 (2000). 土壌還元消毒法.農業技術体系土壌施肥編 5 －①：畑 212 の 6-212 の 9. 農山漁村文化協会. 東京.

新村昭意(2004).還元消毒法の原理と効果.土壌伝染病談話会レポート 22:2-12.

スタニエ, R.Y.,イングラム,J.L.,ウィーリス,M.L.,ペインター,RR.原著 (1989). 微生物学(下),

原著第 5 版, 培風館, 東京.

田場　聡・諸見里善 (2007). 沖縄に分布する３種土壌におけるサツマイモネコブセンチュウおよび土壌微生物相に及ぼす米ぬか混和の影響. 沖縄農業第 40(1):59-67

竹原利明・萩原　康・藤井義晴・平舘俊太郎・長井克将 (1996). カラシナから生じる揮発性物質のホウレンソウ萎ちょう病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae*)に対する生育抑制・殺菌効果,日植病報 62:609. (講要)

竹原利明・半澤祥代・船原みどり・中保一浩・仲川晃生 (2004). カラシナ等植物の鋤込みと土壌還元消毒の組合せによる土壌病害防除の可能性.関東病虫研報 51:176. (講要)

Takehara, T., Hanzawa, S., Funabara, M., Nakaho, K. and Nakagawa, A. (2004). Control of soilborne pathogens using allelopathic plants to lower redox potential of soil. Phytopathology. 94:S101.

竹原利明・井上博書・宮川久義 (2007). カラシナを用いた還元土壌消毒によるトマト萎凋病の防除.日植病報 73:63-64. (講要)

竹原利明 (2008).　生物的土壌消毒による土壌病害の防除.　土壌伝染病談話会レポート No.24:70-81.

武地誠一・菅野義忠 (1995). メチオニンによるダイコン萎黄病の発病抑制効果とその作用機作. 平成 6 年度研究成果情報(東北農業)：133-134.

竹内妙子 (2004). 千葉県における土壌還元消毒法による土壌病害防除. 土壌伝染病談話会レポート 22:13-21.

田代定良 (2006). 臭化メチル代替農薬の効果と普及. 野菜茶業研究集報 3:21-28.

Toyoda, H., Matsuda, K., Dogo, M., Kakutani, K., Akaza, K., Yamashita, S., Imanishi, Y., Matsuda, Y., Hamada, M. and Ouchi. S. (199T). Antibacterial activities of indole against Pseudomonas solanacearum (II). Inhibitory effect of indole derivatives on bacterial growth. Ann, Phytopath. Sac. Jpn. 57:716-719.

上木勝司・永井史郎(編著)(1993).嫌気微生物学, 養賢堂, 東京.

Uematsu, S., Uekusa, H., Kusano, K., Okamoto, M. and .Kita, N. (2003). Use of hot water for soil-borne disease control. Proceedings of 2007 International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions. 73.123.1 -123.2.

Uematsu, S., Tanaka-Miwa, C., Sato, R., Kobara, Y. and Sato, M. (2007). Ethyl alcohol as a promising material of reductive soil disinfestation for contolling root knot nematode and soilborne plant diseases. Proceedings of 2007 Annual International Research Conference on Methy Bromide Alternatives and Emissions Reductions : 75.1-75.3

植松清次・田中千華・佐藤理恵子・小原裕三・佐藤充克. 2008. エタノールを用いた土壌還元消毒. 日植病報 74:46

牛尾進吾・片瀬雅彦・久保周子・山本二美・大塚英一・安西徹郎 (2004). 土壌還元消毒による施設黒ボク土の土壌化学性の変化. 千葉農総研研報 3:105-112

Yokoyama, M. T., Carlson, I. R., and Holdeman, L. V. (1977). Isolation and characteristics of a skatole-producing Lactobacillus sp. from the bovine rumen. Appl. Environ. Mcrobiol. 34:837-842.

柳田友道 (1984). 微生物科学 4 生態. 学会出版センター,東京.

渡辺秀樹・田畑幸司 (2004). 土壌還元消毒法による土壌病害虫防除の現場事例. 今月の農業. 6 月号:21-26.

渡辺秀樹 (2006). 岐阜県における代替技術普及の取り組み～夏秋トマト栽培における土壌還元消毒法の普及事例～ 野菜茶業研究集報 3:43-48.